

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-322892

(43)公開日 平成5年(1993)12月7日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/533		8310-2 J		
C 0 7 K 15/00		8619-4 H		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 11 頁)

(21)出願番号	特願平3-70335	(71)出願人	591067211 ジョン・クルービー ◇◇
(22)出願日	平成3年(1991)3月12日	(72)発明者	ジョン・クルービー アメリカ合衆国07452ニュージャージー州 グレンロック、ラットランド・ロード175
(31)優先権主張番号	4 8 1 5 2 3	(74)代理人	弁理士 倉内 基弘 (外1名)
(32)優先日	1990年3月12日		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 対合ペプチド

(57)【要約】

【目的】 結合アッセイ用の試薬、及びその試薬を用いるイン・ビトロの診断法を提供すること。

【構成】 グルタミン酸残基及びリジン残基を主鎖ポリペプチドが正味の正電荷を有するような比で含む主鎖ポリペプチドを含み、上記の主鎖ポリペプチドが分子質量 2.0×10^5 ダルトン以上を持ち、主鎖ポリペプチドに共有結合した光学的染料標識、主鎖ポリペプチドに共有結合した特異的結合用分子、及び主鎖ポリペプチドに会合した増強ペプチドを有し、上記の増強ペプチドが、
a) 反対の立体化学的配置を有する酸性及び塩基性アミノ酸モノマー残基、又は、b) 酸性アミノ酸及び塩基性アミノ酸のホモポリマーの混合物から成り、このホモポリマーが同一の又は異なる立体化学的配置を取り得、かつ上記の増強ペプチドが電気的に中性か又は正味の負電荷を有する、結合アッセイ用試薬を作成し、用いる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 グルタミン酸残基及びリジン残基を主鎖ポリペプチドが正味の正電荷を有するような比で含む主鎖ポリペプチドを含み、上記の主鎖ポリペプチドが分子質量 2.0×10^5 ダルトン以上を持ち、主鎖ポリペプチドに共有結合した光学的染料標識、主鎖ポリペプチドに共有結合した特異的結合用分子、及び主鎖ポリペプチドに会合した増強ペプチドを有し、上記の増強ペプチドが、a) 反対の立体化学的配置を有する酸性及び塩基性アミノ酸モノマー残基、又は、b) 酸性アミノ酸及び塩基性アミノ酸のホモポリマーの混合物から成り、このホモポリマーが同一の又は異なる立体化学的配置を取り得、かつ上記の増強ペプチドが電気的に中性か又は正味の負電荷を有する、結合アッセイ用試薬。

【請求項 2】 主鎖ポリペプチドがリジン及びグルタミン酸をモル比 3-5:1 で含む、請求項 1 に記載の結合アッセイ用試薬。

【請求項 3】 増強ペプチドが分子質量 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ ダルトンを有し、かつ L-グルタミン酸の D-リジンに対する又は D-グルタミン酸の L-リジンに対する又は L-アスパラギン酸の D-リジンに対するモル比 1:1~2:1 を有するポリペプチドを含むグループから選ばれる、請求項 1 又は 2 に記載の結合アッセイ用試薬。

【請求項 4】 光学的染料がフルオレセインであり、かつ結合用分子が抗体、抗原、ビオチン及びアビジンのグループから選ばれる、請求項 3 に記載の結合アッセイ用試薬。

【請求項 5】 結合用分子が TBG に対する抗体、T₄ に対する抗体、HCG に対する抗体、又はアポ A₁ に対する抗体である、請求項 4 に記載の結合アッセイ用試薬。

【請求項 6】 増強ペプチドが等モル量の酸性及び塩基性アミノ酸のホモポリマーの混合物であり、上記の混合物がポリ L-リジン及びポリ L-グルタミン酸、ポリ D-リジン及びポリ L-グルタミン酸、ポリ D-リジン及びポリ D-グルタミン酸から成るグループから選ばれる、請求項 1 に記載の結合アッセイ用試薬。

【請求項 7】 主鎖ポリペプチドが分子質量約 $5 \sim 10 \times 10^5$ ダルトン、例えば、 1×10^6 ダルトンを有する、請求項 1~4 の内の任意の一つに記載の結合アッセイ用試薬。

【請求項 8】 結合用分子が T₄ に対する抗体、又は結合用分子が TBG に対する抗体、又は結合用分子が HCG に対する抗体である、請求項 7 に記載の結合アッセイ用試薬。

【請求項 9】 前述の請求項の任意の一つの試薬を液体試料に一回、標的分子が上記の試薬と反応するのに十分な条件下で接触させること、及び反応の程度と上記の標的分子の量、有無の関連性を（例えば、その液相の光学

的吸光度（例えば、波長 492~499 nm）を測定すること、及び試料中の標的分子の量、有無を標準曲線を参照することにより決定することによって）示すことを含む、液体試料中の標的分子の量、有無を検出するイン・ビトロの診断方法。

【請求項 10】 関連性を示すステップを、液相の波長 492~499 nm の光学的吸光度の測定、及び試料中の標的分子の量、有無を標準曲線を参照して決定することによって行い、この結合アッセイ用試薬に共有結合した結合用分子が抗-T₄ 抗体、抗-TBG 抗体、抗-HCG 抗体又は抗-アポ A 抗体である、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、結合アッセイ用試薬及び上記の試薬を用いるイン・ビトロ診断法に関係する。この試薬は、特異的結合用分子及び光学的染料標識と共有結合した主鎖のポリペプチドを含み、増強ペプチド (enhancing polypeptide) と会合している。この結合アッセイ用試薬及び上記の試薬を用いる方法は上記の特許請求の範囲に記してある。

【0002】 この対合ペプチド試薬 (paired peptide reagent) は、染料ポリマー結合体 (dye polymer conjugate) と増強ペプチドの複合体であるが、血液、血清、血漿、尿、唾液、涙、汗、リンパ液等の生物学的液体中での様々な結合アッセイにおいて標的分子の存在の有無及び/又は量を光学的に検出するのに有用である。このようなアッセイの実施例は、制限することなく、抗原と抗体間の結合に基づく免疫アッセイ、又はアビジン/ビオチン検出システムを含む結合アッセイを含む。そのようなアッセイにおいて、増強ペプチドはアッセイ感度及び染料ポリマー結合体の結合特性を有意に増大させる。

【0003】 一般的に、この発明の新しい対合ペプチドを用いるアッセイ試験システムは、アッセイ試料中で疑われている標的分子に結合出来る適当な結合用分子を有する染料ポリマー結合体、その染料ポリマー結合体と複合体を形成する増強ペプチド、及び染料からの光学的放射の検出及び/又は定量のための手段を含む。好ましくは、このアッセイは、結合用分子が固相に結合されていて、被検査試料にさらした後で標的分子結合用分子複合体を溶液から分離するのを容易にする競争的結合アッセイである。このアッセイはサンドイッチ型のアッセイでもあり、固相はその上に固定化され標的分子の一部に向けられた結合用分子を有し、標的分子を含む試料にさらされてから、染料ポリマー（増強ペプチドと複合体を形成している）を含む溶液にさらされるが、それは同じ標的分子の異なる部位に向けられた結合用分子を含む。適当な固相の一例はアガロースゲルである。適当な固相の他の例は当業者には明白であり、結合アッセイの分野では周知である。

【0004】この発明のポリペプチド主鎖は染料で高度に置換され得、従って、このアッセイシステムに改良された感度を提供する。例えば、フルオレセインでの置換はこのペプチドの遊離のアミノ基の約60-70%に光学的標識の結合を生じる。フルオレセインで置換されたとき、ポリペプチド主鎖の各分子は600以上のフルオレセイン残基を含んで良く、モル吸光係数 $E_m = 6 \times 10^7$ で相対的分子質量 (relative molecular mass) 8×10^5 ダルトンを与える。吸光度は1リットル当りのモル濃度のモル吸光係数倍に等しい、即ち、数1が成り立つ。

【0005】

【数1】

吸光度

$$E_m = \frac{\text{モル濃度 (モル/1)}}{\text{モル濃度 (モル/1)}}$$

モル濃度 (モル/1)

【0006】

【発明が解決しようとする課題】残りのアミノ基は結合用分子との共有結合に利用出来る。この染料ポリマーをアッセイシステム用の試薬として用いることは、それが多量の標識分子を供給するので非常に好ましい。遺憾ながら、十分には分からない理由により、この染料ポリマーの結合用分子部分は標的分子に全く結合しない訳ではないが良く結合しない。それ故、増強ペプチドを染料ポリマー結合体との混合物の形態で又は染料ポリマー結合体との複合体を形成して供給すると染料ポリマーの結合パラメーターが増大してこの余り役に立たない試薬を顕著に免疫アッセイに適したものにするということを見出したことは驚くべきことである。

【0007】

【課題を解決するための手段】主鎖のポリペプチドは、当業者に既知の任意のペプチド合成法に従って合成して良い。例えば、Blout, E. R. と Karlson, R. H. Journal of the American Chemical Society, 78 巻, 941-946頁, 1956 年 3 月; Hanby, W. E., Waley, S. G. 及び Watson, J. Journal of the Chemical Society, Article 632 巻, 3239-3249 頁, 1950 年; Bodanszky, M., Bodanszky, A., The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Varlay, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984 年, 211 頁; Bodanszky, M., Bodanszky, A., Principles of Peptide Synthesis, Springer-Varlay, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984 年, 211 頁を参照。好ましくは、それらは改変された開環重合法を用いて、アミノ酸N-カルボキシ無水物を利用して合成するのが良い (Leuchs, H.: Beridtsch Chem. Ges. 39 巻, 857 頁, (1906); Leuch

s, H., Geiger, W., 同誌, 41 巻, 1721 頁, (1908))。

【0008】開環重合法において、所望のアミノ酸のN-カルボキシ無水物は、最初、ガンマーベンジル-N-カルボベンゾキシグルタメート及びN-e, a ジカルボベンゾキシリジンナトリウムから五塩化燐との反応によって製造する。結晶反応生成物を精製し、洗浄する。最適のナトリウムメトキシドを増強ペプチドの製造においてN-カルボキシ無水物アミノ酸の重合を開始するのに利用する。

【0009】グルタミン酸及びリジンのN-カルボキシ無水物 (NCA) 誘導体のランダムコポリマーはNCAアミノ酸結晶をジオキサンに溶かし、十分量のナトリウムメトキシドを加えて最適のNCAアミノ酸: イニシエーター比を提供し、その混合物を反応させ、かつ溶媒を蒸発させることにより合成する。ポリペプチド主鎖の製造において、NCAアミノ酸: イニシエーター比は約500:1である。

【0010】グルタミン酸のN-カルボキシ無水物誘導体はリジンのN-カルボキシ無水物誘導体の3倍の速度で重合するので、その結果生じる主鎖のポリペプチドの配列は完全にランダムではない。最終のコポリマーの一端は顕著にグルタミン酸を含み、他端は顕著にリジンを含む。それぞれ約4:1という過剰モル比である。

【0011】重合の後、リジン及びグルタミン酸の保護されているイブシロンアミノ基及びガンマーカルボキシル基をそれぞれ、再蒸留氷酢酸及び酢酸中の臭化水素を用いて脱保護する。4-12℃で3日後、ポリマーをエーテルで沈殿させ、濾過により塊として回収する。その塊をpH9-10に調整された0.5M NaOHに再懸濁し、その溶液を約8,000-10,000以下の分子量を透過させる Spectra-por膜 (Spectra Medical Industries製, Los Angeles, California) に入れて脱イオン水に対して数日間透析する。透析後、生成物を凍結乾燥し、フルオレセイン又はローダミンなどの光学的染料で標識する。

【0012】染料分子は、蛋白質及びペプチドをローダミン又はフルオレセインなどの光学的染料で標識するための当業者に既知の方法; 例えば標準イソチオシアネート反応を用いて主鎖ポリペプチドのアミノ基に結合し得る。好ましくは、この発明の主鎖ポリペプチドは、引用したWier, D. M., Immunochemistry, 28 巻, 405 頁, 4 版, Blackwell Publications, Boston, 1986 年の方法に従って、フルオレセインイソチオシアネートをゆっくりと加え、続いて透析及び分子ふるいクロマトグラフィーで精製することにより、フルオレセインで標識する。

【0013】この染料ポリマーは中性又は弱アルカリ性水性媒質に可溶性である。それは又ジメチルホルムアミドにも可溶性である。染料ポリマーの溶液は同濃度の未反応のポリペプチド主鎖を含む溶液より粘性が低い。

10

20

30

40

50

【0014】染料ポリマーの製造の後で、適当な結合用分子を染料ポリマーに共有結合させて染料ポリマー結合体を形成する。結合用分子をポリペプチドのアミノ基に共有結合させるための適当な方法は、当業者には周知である。そのような方法の一つは、Carlsson, J., Drevin, H. 及びAxen, R., Biochemical Journal, 173巻, 723頁, 1978年に開示されている。好ましくは、用いられる結合方法は、Carlsson *Supra*により教示されたものの変法であり、そこでは、ポリペプチド及び結合用分子は、最初、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート

(SPDP)で修飾され、続いてジスルフィド結合で結合される。SPDPは、一つのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル部分及び一つのs-ピリジルジスルフィド部分を含むヘテロ二官能性試薬である。このエステルはポリマーの第一級アミノ基と反応して安定なアミド結合を形成する。修飾されたポリペプチドは、ジチオスレイトール(DTT)で還元される2-ピリジルジスルフィド構造を含む。この還元反応は、ピリジンチオンの遊離を生じ、遊離のスルフヒドリル基を有する修飾されたポリマー(チオレート化ポリマー)を生成する。遊離されたピリジンチオンの濃度は分光測光的に監視され、その得られる値が被修飾ポリペプチドに導入されたスルフヒドリル基の数の程度である。第二に、結合用分子は染料ポリマーを修飾するのに用いられたのと同じ方法によってSPDPで修飾されるが、2-ピリジルジスルフィド構造の還元は行わない。SPDP修飾された結合用分子は、二成分を緩衝液中で一晩混合することによりチオレート化ポリマーに共有結合される。反応をヨード酢酸のナトリウム塩を加えることにより停止させ、染料ポリマー結合体を数回の沈殿及び遠心分離により精製する。精製された染料ポリマー結合体を0.15MトリスpH 8.5に約350-400AU/mlに懸濁させる。

【0015】増強ペプチドは、好ましくは、約 $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ ダルトンの分子量のペプチドであるが、この範囲外の値のものも使用出来る。増強ペプチドを、等しい数の陽及び陰電荷又は過剰の陰電荷を生じるような酸性アミノ酸の塩基性アミノ酸に対する比で合成するということはこの発明の重要な面である。即ち、酸性成分は塩基性成分と等モル量か又は塩基性成分より過剰にあってよく、最大の正味の陰電荷1.5を生じる範囲にあってよい。好ましくは、塩基性及び酸性アミノ酸は反対の立体化学的配置(即ち、D及びLアミノ酸)を持つのが良い。

【0016】増強ペプチド中で用いるのに適当な酸性アミノ酸の例は、L-アスパラギン酸塩、D-アスパラギン酸塩、L-グルタミン酸、及びD-グルタミン酸である。増強ペプチド中で反対の立体化学的配置の酸性アミノ酸と組み合わせるのに適当な塩基性アミノ酸の例は、L-リジン、D-リジン、L-アルギニン、D-

アルギニン、L-ヒスチジン、D-ヒスチジン、及びL-オルニチンとD-オルニチンである。

【0017】好ましくは、この増強ペプチドコポリマーは、反対の立体化学的配置のアスパラギン酸及びリジン残基又は反対の立体化学的配置のグルタミン酸及びリジン残基を含み、分子量 $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ ダルトンを有する。最も好ましくは、この増強ペプチドは、L-グルタミン酸とD-リジンの、又はD-グルタミン酸とL-リジンのそれぞれ1:1~2:1の適当なモル比のランダムコポリマーである。このようなペプチドは、好ましくは、分子量約 1×10^5 ダルトンを有する。比が大きいと安定な結果を生じるが、グルタミン酸のリジンに対するモル比が増大するにつれて、その結果の増強ペプチドの活性は減少し、従って、低いモル比のときと同様の所望の結果を達成するためには、より完全な増強ペプチドを必要とするということが見出されている。

【0018】別法として、増強ペプチドは酸性アミノ酸のホモポリマーと塩基性アミノ酸のホモポリマーの混合物であってよい。染料ポリマー結合体の非特異的結合を減らすためにホモポリマーの混合物を用いた場合は、二種類のホモポリマーは同じか又は反対の立体化学的配置を持ち得る。しかしながら、両ペプチドがL型であるホモポリマー混合物は、結合の増強活性が、D及びL、又は二種類のD型ポリペプチドの混合物より有意に低いということが観察されている。好ましくは、混合するホモポリマーは、D-リジン(Mr 14K)とL-グルタミン酸(Mr 77K)ホモポリマー、D-リジン(Mr 13K)とD-グルタミン酸(Mr 66K)ホモポリマー、又はD-リジン(Mr 26.3K)とD-グルタミン酸(Mr 66K)が良いが、アミノ酸は上述と同じ比で存在する。

【0019】増強ペプチドは、それらの組み合わせられた立体化学的配置のために、染料ポリマー結合体に結合してアッセイ用試薬複合体を形成し、それは、染料ポリマー結合体が単独で用いられる場合と比較して、アッセイ処理において有意に増強された結合性を示す。好ましくは、酸性アミノ酸残基の塩基性アミノ酸残基に対するモル比は、2:1~1:1の範囲内であり、最も好ましくは約1:1である。この発明の試薬は、染料ポリマー結合体と増強ペプチドとの混合物(恐らくは、複合体)であり、濃度は増強ペプチドの酸性残基の塩基性残基に対するモル比により変化する。例えば、酸性残基の比が増えるにつれて、小さい比において得られるのと同じ結果を達成するのに要する増強ペプチドの量は増加する。従って、適当な濃度は、混合物の全重量に対して増強ペプチドが50~97%であり、好ましくは、65~90%であって、残りは染料ポリマー結合体である。これらの濃度は、1mgの染料ポリマーが80吸光度単位を有することに基づいている。

【0020】出願人は、この増強ペプチドの作用様式が

如何なる特定の理論に束縛されることも希望しないが、現在、これらのペプチドはその電荷、形状及び比較的小さな大きさであることにより染料ポリマー結合体に結合出来るマイクロコロイド又はミセルを形成すると考えられている。その結果の複合体はより球状に成り、それ故標的分子と反応し易く成る。ペプチド鎖の方向はアミノ酸残基の配置が変化する各点において効果的に変わるので、D及びLアミノ酸を取り込むことは増強ペプチドの活性に重要であるということも又論じられている。このことは、同一の配置を有するアミノ酸から成るペプチドより一層球形のペプチドを生じさせると信じられている。球形であることが増強ペプチドの染料ポリマーとの結合を増大させ、それ故、アッセイシステムで要求される結合において増強ペプチドの正の効果を増大させると仮定されている。

【0021】酸性及び塩基性ホモポリマーの混合物の場合、試験結果は、反対に荷電しているホモポリマーも又染料ポリマー結合体に効果的に結合出来る球状複合体に会合するということを示唆する。この会合した複合体の大きさも又、まだ分かっていない方法で染料複合体への結合に影響するようである。例えば、D-リジンとL-グルタミン酸の混合物は、少なくとも一方のホモポリマーの分子量がある臨界量を越えて増加すると活性の減少を示す。これは、システムの特性及び用いられる様々なポリマー及び材料によって変化する。

【0022】増強ペプチドはポリペプチド合成のための適当な公知の方法によって合成することが出来、特に、前述したポリペプチド主鎖の合成に用いたのと同じ方法で合成出来る。従って、例えば、適当な酸性及び塩基性アミノ酸のN-カルボキシ無水物誘導体はナトリウムメトキシドを重合のイニシエーターとして用いて重合する。重合並びに保護されたアミノ基及びカルボキシル基の脱保護の後、そのペプチドを6,000-8,000以下の分子量を透過させる Spectra-por膜に入れて脱イオン水に対して二日間透析し、そして凍結乾燥する。

【0023】増強ペプチドの凝集は、染料ポリマー結合体との複合体を沈殿させるだけでなく複合体形成を阻害もするということが観察された。それ故、このペプチドの溶解度は少なくとも部分的に、非特異的結合を減らす機能のある分子量の上限を決定すると考えられる。阻害的凝集の除去を確実にするために、凍結乾燥した増強ペプチドを300,000×gで2時間超遠心分離し、上清を試験用にとって、1) 非特異的結合アッセイにおける活性、2) ゲル濾過による相対的分子質量、及び3) 酸加水分解後のHPLCによる酸性アミノ酸残基の塩基性アミノ酸残基に対する比を決定した。

【0024】染料ポリマー結合体及び増強ペプチドは続いでの後者を伴う結合アッセイに用いるためにプレミックスするが、後者はペプチドを加えた複合体の混合物に対して50~97、好ましくは、65~90重量%存在

する。この発明の対合したポリペプチド試薬は、アビジン/ビオチンアッセイなどの非免疫学的アッセイにおいて結合を増大させるのに有効であるが、免疫学的アッセイ、特に、競争的結合アッセイ、及び特に、チロキシン(T₄)などの小さい分子及びチロキシン結合性グロブリン(TBG)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)及びアポーA₁などの大きい分子を含むアッセイで用いられるとき特に有用である。

【0025】下記の実施例はこの発明の特定の具体例を説明するだけであり、発明はそれに限定されないことは理解される。実施例中で又は明細中の何処かで様々な成分の量はすべて、別に明示されている場合以外は、重量による。

【0026】

【実施例】

実施例1

染料ポリマー結合体を合成するために、まず、L-リジンとL-グルタミン酸の4:1のランダムコポリマーを、下記のプロトコールに従って、アミノ酸N-カルボキシ無水物の開環重合を用いて合成した。

【0027】1. ガンマーベンジルN-カルボキシーL-グルタメート無水物(g-Bz-L-GLU-NCA)の合成。すべてのガラス器具類を洗剤と熱水で洗い、まず脱イオン水で、次いでアセトンですすぎ、120℃で少なくとも2時間乾燥した。反応前に、反応容器を反応媒質中で用いる溶媒ですすいだ。

【0028】ガンマーベンジルーN-カルボベンゾキシーL-グルタメート4gを乾燥した100mlの攪拌棒を装備した丸底フラスコに入れ、試薬粒子を確実に溶解させるために破碎した。無水エーテル24mlを加え、乾燥用チューブ(drying tube)を挿入した。反応物を室温で30分間穏やかに攪拌して溶解した。完全に溶解した後、反応混合物を、攪拌を続けながら、氷浴中で10℃に冷却した。五塩化燐(PCl₅)粉末(2.69g)を素早く加え、攪拌を10℃で続けた。約30-40分で、反応混合物は固化した。

【0029】ガード乾燥用チューブ(guard drying tube)付きのロータリーエバポレーターにアセトンとエーテルを流した。エーテル層を蒸発させると、白色の固体が残った。酢酸エチル15mlを加えて、攪拌し、そして蒸発させた。無水の酢酸エチルを加えて蒸発させることを繰り返した。透明なシロップが得られた。

【0030】このシロップを無水の酢酸エチル約10mlに溶解させた。必要なときは、混合物を油浴中で50℃に加熱する。無水ヘキサンを溶液が濁るまで加えた。溶液を室温まで冷却し、次いで、フラスコに乾燥用チューブをしっかりと付けて、フリーザー中に一晩置いた。

【0031】その結果生じた結晶をブフナー漏斗で、P-4フィッシュヤーろ紙を用いて濾過し、ヘキサンで2回洗い、そしてデシケーター内で真空中で乾燥させた。こ

の生成物の融点は84-88℃のはずである。

【0032】2. N-e-CBZ-N-a-カルボキシ-L-リジンのNCAの合成。N-a-N-eジ-CBZ-L-リジン5gを乾燥した100mlの撹拌棒付きの丸底フラスコに入れた。無水エーテル25mlを加えて、混合物を撹拌し、スラリーを得た。10℃の氷及び水浴中で冷却後、五塩化燐2.8gをスラリーに、10℃で撹拌しながら加えた。約30分で、透明な溶液を生じた。

【0033】エーテルを、回転式蒸発 (roto-evaporation) 及び無水酢酸エチル (15mlを2回分) との共蒸発 (co-evaporation) により除去した。白色の固体が得られた。

【0034】この結晶を、無水酢酸エチル15ml及び無水ヘキサン約5mlから再結晶したが、ヘキサンを加える前に、溶液を油浴中で約50℃に加熱した。次いでそれを室温まで冷却し、乾燥用チューブ付きの容器に入れて4℃の冷却器の中に一晩置いた。

【0035】この結晶をブフナー漏斗上で集めて、ヘキサンで洗い、真空中で乾燥した。この生成物の融点は90-95℃のはずである。

【0036】3. ランダムコポリマーの合成。g-ベンジル-L-グルタミン酸のNCA0.95gを撹拌棒と乾燥用チューブを付けた500mlの丸底フラスコに入れた。無水ジオキサン (Aldrich SureSeal) 57mlを加え、撹拌して溶解させた。無色の溶液を生じた。

【0037】N-e-CBZ-N-a-カルボキシ-L-リジンのNCA4.38gを乾燥した100mlのフラスコに入れ、ジオキサン44mlを加えた。無色の溶液を生じた。

【0038】リジン溶液をグルタミン酸溶液に加え、次に、無水メタノール中の新鮮な0.14M ナトリウムメトキシド溶液を加えて無水物：イニシエーター比を500:1にした。NCA溶液を激しく撹拌しながら、ナトリウムメトキシドをシリンジから滴下した。イニシエーターの添加の後、乾燥用チューブをフラスコに取り付けた。反応を、室温で1時間撹拌して行い、次いで、遮光して室温に一晩置いた。

【0039】翌日、回転式蒸発により溶媒を除去し、ペースト状の残留物を得た。この生成物を真空デシケーター中でDrierite上で少なくとも4時間乾燥した。

【0040】4. ポリペプチドの脱保護。再蒸留氷酢酸50mlを保護されたポリペプチドに加え、その混合物を固体粒子が殆ど溶解するまで、約15分間撹拌した。酢酸中の30%臭化水素100mlを、次いで、加えた。

【0041】室温で水分の無い状態で1時間撹拌した後、透明乃至黄色味がかった溶液が得られるが、それは約15-20分で濁る。その時点で、フラスコを冷却箱に移し、3日間撹拌した (4-12℃)。濃いスラリー

が出来た。

【0042】3日間冷却した後、エーテル1容 (150-200ml) を加え、その混合物をフリーザー中に2時間置いた。沈殿をP-4ろ紙を付けたブフナー漏斗上で濾過し、その塊をエーテル20mlで2回洗った。

【0043】その塊を250mlの三角フラスコに移し、0.05M NaOH100mlを加えて、濁った溶液を作った。pHを9-10に調整した。水を加えて150mlにし、その試料を、約8,000-10,000ダルトン以下の分子量について透過性のSpectra-por膜内に入れた。その試料を4×8L容の脱イオン水に対して2日間室温で透析し、凍結乾燥した。

【0044】5. ポリペプチドの特徴付け。相対的分子質量 (Mr) を基準化されたセファロースCL-6Bカラム上で、ゲル濾過により決定した。

【0045】リジンのグルタミン酸に対する比は、HPLCで決定したところ、4.00:1.01であった。上記の方法において出発材料を適当に変えることにより、様々な比を作り得る。

【0046】6. ポリペプチド主鎖の標識。L-リジンとL-グルタミン酸のランダムコポリマー (ポリペプチド主鎖) を、下記の方法で、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) の添加により、フルオレセインで標識した。

【0047】1. ペプチド主鎖の精製

a) ランダムコポリマー {ポリ (Glu, Lys, HBr) 1:4、分子量約380,000 (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., Cat No. P-0650) 購入} をビカルボネート緩衝液、0.15M、pH9.5、100ml中に溶解した。その溶液を2×1L容の同緩衝液に対して室温で48時間透析した。

【0048】2. FITC標識されたペプチド主鎖の製造

a) 残留物 (ペプチド主鎖75mgを含む) を250mlの琥珀色の撹拌棒を備えたフラスコに入れた。

【0049】b) フルオレセインイソチオシアネート350mgを計り、乾燥した琥珀色のフラスコ中の無水ジメチルホルムアミド65.0ml中に溶解した。

【0050】c) FITC溶液を乾燥した琥珀色の分液漏斗に移した。

【0051】d) ペプチド溶液を激しく撹拌しながら、FITCを約2秒に1滴の速度で加えた。

【0052】e) FITC添加の後、反応を5時間撹拌しながら行った。

【0053】3. FITCで標識されたペプチド主鎖の精製

a) FITC標識された主鎖ポリマーを2×4L容のビカルボネート緩衝液に対して2時間透析した。

【0054】b) FITC標識されたペプチドを、Spectra/Por UF膜 (MWCO 1×10⁶) を取り付け

たSpectrum限外濾過装置 (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA) にかけて、0.05M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 9.0、1.0Lで溶出し、次いで、25ml容に濃縮した。

【0055】c) この溶液を、前もって0.05M リン酸塩緩衝液、pH 7.5で平衡化したセファデックス G-25カラム (2.5cm×54cm) 上で精製した。

【0056】d) ボイドピーク画分 (50ml) を採取した。

【0057】4. FITC標識したペプチド主鎖の特徴付け

a) セファデックス G-25カラムから溶出したボイドピークに含まれるポリマーの吸光度単位の数値を測定した。

【0058】b) 溶出液50mlを10%酢酸で沈殿させ、ペレットを水で洗い、遠心分離し、次いで、凍結乾燥した。

【0059】c) 残留物の重量を測定し、残留物1.0mg中に含まれる吸光度単位の数を (b) を基準体積として、計算した。

【0060】FITC標識されたポリペプチド (染料ポリマー) を、次いで、下記の方法で抗体に結合した。

【0061】1. 抗体及び染料ポリマーのSPDP誘導体生成。エタノール (6.67ml) を、エタノールですすいだシリンジを用いて、ガラス製円錐形遠心管に入れた。乾燥した部屋で、エタノールをSPDP (デシケーター中に保存) 10mgに加えて1.5mg/mlにした。実験室では、これらの成分を溶解するまで良く混合した (10-15分)。

【0062】抗体70mgを琥珀色のバイアルに入れた (抗体濃度は3-5mg/mlである)。抗体1モル当たり8.6モルのSPDPを、4つのアリコートに5分間隔で、攪拌しながら加えた。次いで、そのバイアルを、攪拌を止めて、75分間放置して反応を起こさせた。

【0063】染料ポリマー10,000AUを150-200AU/mlで計量し、100mlの琥珀色の瓶に入れた。残りのSPDP3.5mlをエタノールで10.5mlに希釈した (終濃度0.5mg/ml)。染料ポリマー1モル当たり30モルのSPDPを4つのアリコートに5分間隔で、攪拌しながら加えた。攪拌を、更に、2時間15分続けた。

【0064】SPDP誘導体形成した抗体を2.5cm透析チューブに入れて、1リットルの0.1M PO4、0.1M NaCl、緩衝液、pH 7.4に対して一晩4℃で透析した。

【0065】SPDP化された染料ポリマーを2リットルの0.05M PO4、pH 7.5に対して一晩4℃で透析した。

【0066】2. SPDP誘導体化した染料ポリマー

の還元。染料ポリマーを透析チューブから取り出し、総容積を測定した。染料ポリマーに加えるべき0.2M DTTの量を、終濃度0.02M DTTを得るように計算し (染料ポリマー容積×11%)、計算した容積のDTTを清浄なキャップをした琥珀色の瓶中で攪拌しながら反応させた。

【0067】反応後、還元したポリマーを、10%酢酸で溶液のpHを5に下げることにより沈殿させた。試料を50mlの円錐形管に入れて冷却遠心分離した。ピリジン-2-チオンの測定及びこのポリマーに導入されたスルフヒドリル基の数の測定用に上清を保存した。

【0068】各ペレットを0.01M 酢酸塩緩衝液、pH 5、50ml中に分散させ、良く混合して、遠心分離した。上清を捨て、この操作を繰り返した。冷却遠心分離し、上清を捨てる操作は、遠心管を替えて行い、この生成物を0.01M酢酸ナトリウムで更に3回洗った。

【0069】ペレットを脱イオン水で1回洗い、上清は捨てた。そのペレットを、次いで、出発材料各200AU当り、0.05M PO4、pH 7.4、1.0ml中に溶解させた。直に、0.5M リン酸二水素ナトリウムを用いて、pHを7.5に調整した。このポリマーの一部 (0.1ml) を0.15M トリス緩衝液、pH 8.5で1:200に希釈し、492nmで測定した。回収した濃度及び全AUを計算した。試料を、結合用に、約100AU/mlに希釈した (一度還元したポリマーを希釈したら、抗体を30分以内に加えなければ成らない)。

【0070】チオール基の濃度はCarlsson Supraの方法に従って計算した。

【0071】3. SPDP抗体の処理。SPDP抗体を透析チューブから取り出し、体積を測定した。抗体濃度は、280nmで吸光度を読むことにより測定した。

【0072】4. 染料ポリマーの抗体への結合。利用可能な抗体の総mg及び利用可能な還元されたポリマーの総AUを計算した。各1,000AUのポリマーに対しSPDP修飾された抗体6.6mgを用いて、形成され得た結合の量を計算したが、1.0mgのSPDP化抗体はチオール基の試験用に保存した。

【0073】還元したポリマーを攪拌棒を備えた透明なガラス瓶に100AU/mlで入れた。抗体を、混合物を攪拌しながら加え、次いで、その混合物を攪拌用プレートから降ろし、室温で一晩インキュベートした (抗体上のチオール基の数はCarlssonの方法に従って計算した)。

【0074】結合反応は、その翌日に、1.0M ヨード酢酸ナトリウム塩を各10,000AU当り100ml加えることにより停止した。数分間の混合の後、混合物を攪拌なしで2時間放置した。

【0075】5. 沈殿による結合物の精製。この結合

物を、各2500AU当り、一本の50mlプラスチック遠心管に移し、1.0M リン酸水素二ナトリウムでpHを5.5に下げた。冷却遠心分離後、上清を捨てた。

【0076】各ペレットを冷0.15M NaCl 50ml中に分散させ、遠心分離して、そしてデカンテーションした。この洗浄処理を繰り返した。

【0077】ペレットを約10mlの0.01M トリス、pH8.5中に再溶解し、次いで、清浄な50mlのプラスチック遠心管に移した。pH調整、遠心分離及びNaClでの洗浄を繰り返した。各ペレットを0.01M トリス、pH8.5、10ml中に再溶解して、この操作を清浄な遠心管を用いて繰り返し、最終的に、ペレットを0.15M トリス、pH8.5中に、約250~400AU/mlで再溶解させた。3つの20μlのアリコート、0.15M トリス(1:200)で4mlに希釈し、492nmでO.D.を読んだ。200倍した読みの平均値を用いて濃度を求めた。

【0078】実施例2

レ-グルタミン酸とD-リジンをモル比6:4でそれぞれ含む代表的増強ペプチドの合成は、実施例1で主鎖ポリペプチドの合成用に記述された様にして、下記の改変を伴って達成された。

1. 用いたg-ベンジル-レ-グルタミン酸のNCAの量は2.84gであった。

2. 用いたN-e-CBZ-N-aカルボキシ-D-リジンのNCAの量は2.19gであった。

3. 無水物:イニシエーター比、50:1を得るために用いたナトリウムメトキシドの容積は2.5mlであった。

4. 透析後に得たペプチドを300,000×gで、2時間、超遠心分離した。その上清を回収し、凍結乾燥した。

5. そのポリペプチドの特徴付け:相対的分子質量(M_r)を、基準化したセファクリルS-300カラム上のゲル濾過により決定した。

6. グルタミン酸のリジンに対する比をHPLCにより決定し、6.02~4.01であることを見出した。前述のものより大きいか又は小さいかは、前述の方法において用いられたグルタミン酸及び/又はリジンの量を適当に調整することにより作り得る。

【0079】実施例3

増強ペプチドの活性の比較

L-glut:D-lys、D-glut:L-lys、L-aspart:D-lys、L-glut:D-lys、D-glut:D-lysの比が6:4の及びD-lys及びL-glut又はL-lys及びD-glutのホモポリマーの混合物から成る増強ペプチドは免疫アッセイによって免疫反応におけるそれらの染料ポリマー結合体の標的分子に対する結合を増強する活性を試験した。

【0080】TBG免疫アッセイ:TBGの免疫アッセイは、抗-TBG-染料ポリマー結合体の循環TBGへの結合能力と、その後、抗-TBG-染料ポリマー-TBG複合体が固相上に固定化されたT₄によって捕獲されることに基づいている。

【0081】実施例1の様にして製造した抗-TBG-染料ポリマー結合体(8AU)100mgを、6:4のD-glut:L-lys比の増強ペプチドの2.5%溶液400μlと、実施例2の様にして製造した増強ペプチド2mgを含む0.05Mトリス緩衝液、pH8.5中でプレミックスした。この混合物は、現在、(増強ペプチドを加えた染料ポリマーの重量に対して)約96%の増強ペプチドを含むが、TBGを含む検体に加えた。次に、固定化T₄を有しているゲルの懸濁液1mlを加え、液相の492nmの吸光度の増加を60分間のインキュベーションの後に測定した。少なくとも300ミリアUの吸光度の増加は、有意の増強ペプチド活性を表すと考えられた。

【0082】この免疫アッセイにおいて、6:4のL-glut:D-lys比の増強ペプチドは、約60μg/mlのTBGを含む試料中で、約2000ミリアUの吸光度の変化を与える。L-glut及びL-lys又はD-glut及びD-lysから成る類似の増強ペプチドは、このアッセイにおいて殆ど又はまったく吸光度の変化を与えないが、これは酸性及び塩基性アミノ酸が同じ立体化学的配置を有する増強ペプチドは免疫アッセイにおいて染料ポリマー結合体の結合を有意に増強させないということを示唆している。

【0083】酸性及び塩基性アミノ酸のホモポリマーの混合物は、TBGアッセイにおける非特異的結合の阻害をも試験した。染料ポリマー結合体を添加する前に、等モル量のホモポリマーを、pH8.5で、水に混合した。60μg/mlのTBGを含む試料を用いて得られた結果を下記の表に示す。

【0084】

【表1】

表1

吸光度変化 (ミリAU)

a) ポリL-lys (3.5K) / ポリL-glu (70K)	374
b) ポリD-lys (13K) / ポリL-glu (77K)	536
c) ポリD-lys (13K) / ポリD-glu (66K)	502
d) ポリL-lys (21.5K) / ポリL-glu (77K)	256
e) ポリL-lys (21.5K) / ポリL-glu (66K)	92
f) ポリD-lys (26.3K) / ポリL-glu (77K)	96
g) ポリD-lys (26.3K) / ポリD-glu (66K)	551

【0085】試料a、b、c及びgは、結合の増強において容認出来る性質を示している。これらの結果は又、立体化学的配置が活性にとって重要である単一の増強ペプチドとは対照的に、ホモポリマーがポリマーの複合体中で用いられる場合は、同一の立体化学的配置が機能的

体の大きさの影響も又ある。

【0086】下記の表(表2)は、普通に患者の血漿中で遭遇するTBG濃度の範囲に渡る組成物の活性を示している。

20 【0087】

【表2】

表2

TBG抗原濃度

($\mu\text{g}/\text{ml}$)

=====

0

10

20

30

40

50

60

492nmの吸光度の

変化 (ミリAU)

=====

0

352

660

1, 148

1, 560

1, 660

1, 948

【0088】実施例4

T₄ 結合アッセイ: この免疫アッセイの形式は、T₄ を含む試料と反応した抗-T₄ 染料ポリマーの添加と、その後、未結合の抗-T₄ 染料ポリマー結合体を捕獲するための固体支持物上に固定化されたT₃ を添加することに基づいている。

【0089】8-アニリノナフタレンスルホネート(ANS)の2%溶液100 μl を、表3に示されたレベルのT₄ を含む試料に加え、その後、前もって実施例2における様にして調製したトリス、pH8.6中の増強ペプチドの2.5%溶液400 μl と混合した抗-T

40 4-染料ポリマー結合体(8AU)を加えた。共有結合したT₃ を含む50%ゲル懸濁液1mlを最後に加え、この混合物を15-60分間インキュベートした。492nmの吸光度を読み、吸光度の変化を前述したように測定し、計算した。T₄ を約1ng含む試料において、吸光度の最小の許容される減少は約300ミリAUである。下記の表3は、T₄ -モノクローナル抗体-染料ポリマー結合体を、6:4の比の増強ペプチドと共に用いたときの免疫反応性を示している。

【0090】

【表3】

表3

T ₄ 抗原濃度 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	492nmの吸光度の 変化 (ミリAU)
=====	=====
0	0
2.5	202
5.0	338
10.0	832
15.0	1256
25.0	1658

【0091】血清試料の試験を上記の試薬の錠剤を用いて行った場合は、その結果は市販の試験キットを用いて得られるものと一致した。

【0092】T₄ 結合アッセイにおいて、6:4のD-glucoseとL-Lysを含む増強ペプチドとしてのランダムコポリマーは、6:4のL-glucoseとD-Lysの増強ペプチドに匹敵することが見出された(15分後で、それぞれ、1,363ミリAU及び1,166ミリAUの吸光度変化)。6:4のL-AspとD-Lysのランダムコポリマーも又、1時間後で414ミリAUの吸光度変化で、許容出来る増強活性を示した。1:1のL-glucose:D-Lysの増強ペプチドを6:4の比の材料の代わりに用いた場合、6:4の材料に類似の及び匹敵する吸光度の変化を生じる増強ペプチドの量が10倍減少した。

【0093】実施例5

ヒト絨毛性ゴナドトロピン免疫アッセイ

HCGのモノクローナル抗体を8AU(0.1mg)、

実施例1における様にして調製したFITC標識したポリマー結合体及び6:4の増強ペプチド(実施例2における様にして調製)2.0mgを0.05Mトリス緩衝液、pH8.5、1.0ml中に含む試薬溶液を調製した。その溶液を混合し、室温に30分間放置した。

【0094】HCGを0、100及び200ミリIU含む0.05Mトリス緩衝液を400 μl 含む一連の管に、上記の試薬溶液を1.0ml加えた。その管を、それから、室温で2時間混合した。

【0095】次いで、従来からのシアノゲンブロミド法でウルトラゲル(Ultragel)に共有結合させたヤギの抗-HCG IgGを含む、0.05Mトリス緩衝液、pH8.5中の50%ゲル懸濁液を2ml加えた。その管を、それから、2時間室温で混合した。その上清のアリコートを取り出し、トリス緩衝液で希釈して、492nmで吸光度を読んだ。

【0096】

【表4】

表4

HCG濃度 (ミリIU* /管)	492nmの吸光度の 変化 (ミリAU)
=====	=====
0	0
100	11
200	56

1.0ミリIU = 1.3ng

【００９７】前述の詳細な説明は単に説明のためのものであり、この発明の趣旨を離れずに変形がなされ得るこ

とは理解される。